

## ⑫ 公表特許公報(A)

昭62-501628

⑬ 公表 昭和62年(1987)7月2日

⑭ Int.Cl.<sup>4</sup>  
A 61 K 35/14

識別記号

庁内整理番号  
8615-4C審査請求 未請求  
予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(2)

(全4頁)

⑮ 発明の名称 創傷治療剤

⑯ 特 願 昭60-505204

⑰ 出 願 昭60(1985)11月8日

⑱ 翻訳文提出日 昭61(1986)7月28日

⑲ 国際出願 PCT/US85/02205

⑳ 国際公開番号 WO86/03122

㉑ 国際公開日 昭61(1986)6月5日

優先権主張 ㉒ 1984年11月29日 ㉓ 米国(US) ㉔ 676471  
㉕ 1985年10月10日 ㉖ 米国(US) ㉗ 786206

⑳ 発 明 者 ナイトン, デービッド・アール アメリカ合衆国 Wisconsin 州 54016, ハドソン, ルート 3, ボックス 157

㉑ 出 願 人 キュラテック・インコーポレー アメリカ合衆国 ミネソタ州 55403, ミネアポリス, スイート 400, テッド マーケット・アベニュー 1201

㉒ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外5名

㉓ 指 定 国 AT, AT(広域特許), AU, BE(広域特許), BR, CH, CH(広域特許), DE, DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB, GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, LU, LU(広域特許), NL, NL(広域特許), NO, SE, SE(広域特許), SU

## 請求の範囲

(1) 生理学的に活性な創傷治療物質を調製する方法であつて、

a) 血液とシトレート-ホスフェート-デキストロース溶液とを混合し;

b) 該血液から血小板に富む血漿を分離し;

c) 血小板を活性化し;そして

d) 活性化血小板に富む血漿を凝結品質コラーゲンキャリアーと混合する;  
各工程から成る上記方法。

(2) 血小板をトロンビンで活性化する請求の範囲第1項記載の方法。

(3) a) 血液から血小板に富む血漿液を分離し;

b) 該血小板を活性化して血小板由来の成長因子と血管形成因子を生産させる;  
ことから成る血小板由来の成長因子および血管形成因子の生産方法。

(4) 血小板をトロンビンで活性化する請求の範囲第3項記載の方法。

(5) a) 動物から血液試料を採取し;

b) 該血液試料から血小板に富む血漿を分離し;

c) 血小板に富む血漿1ml当たり約1~10単位のトロンビンを用いて該血小板を活性化する;  
ことから成る創傷治療物質の生産方法。

(6) a) 血液試料を採取し;

b) 該血液から血小板に富む血漿面分を分離し;

c) 該血小板をトロンビンで活性化し;そして

d) 得られる血管形成因子と成長因子を上記の活性化面分から分離する;

ことから成る血小板由来の血管形成因子と成長因子の *in vitro* 生産方法。

(7) 血小板由来の血管形成因子および成長因子、ならびにキャリアーを含有する創傷治療用組成物。

(8) 前記キャリアーは凝結品質コラーゲンである請求の範囲第7項記載の組成物。

(9) 請求の範囲第7項記載の組成物を創傷部位に塗布することから成る創傷修復の促進方法。

(10) 請求の範囲第7項記載の組成物を創傷部位に毎日投与することから成る創傷の治療方法。

(11) a) ある容量の血液を用意し;

b) 該血液に、体内で凝血を予防するために使用し得る型の抗凝固剤を添加し;

c) 該血液から血小板に富む血漿面分(血液1ml当たり少なくとも1000000個の血小板を含む)を分離し;そして

d) 血小板に富む血漿10ml当たり約1~約10単位のトロンビンを加える;

各工程から成る血液から血小板由来の血管形成因子と成長因子を抽出する方法。

(12) 1ml当たり約1000000000個の血小板濃度へ濃縮する請求の範囲第11項記載の方法。

本出願は1984年11月29日付の係属中の特許出願第676471号の一部続出願である。

#### 発明の分野

本発明は創傷治療剤（特に血管形成因子および成長因子）、血液からのそれらの調製法、および創傷の治療を促進するためのそれらの使用に関する。

#### 発明の背景

線維増殖およびコラーゲン合成をともなう毛細血管内皮細胞の増殖および制御された成長である血管形成 (angiogenesis) は、創傷に対して宿主が応答する欠くことのできない要素である。血小板の活性化および血液凝固カスケードは損傷に対する第一の反応に含まれる。

トロンビンによって活性化された血小板は、線維芽細胞や平滑筋細胞のためのマイトジェン（すなわち成長因子）を放出し、*in vitro* において平滑筋細胞によるコラーゲン合成を刺激する。マイトジェン（血小板由来成長因子、以後 PDGF と略す）は2つのポリペプチドから成る。PDGFに関する論文はグローテンドルスト (G.R.Grotendorst)、チェン (T.Chang)、セバ (H.E.J.Seppa)、クライマン (H.K.Kleinman) およびマーチン (G.R.Martin) の「血小板由来成長因子は血管平滑筋細胞の化学誘引剤である」と題する *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 113, p. 261-266 (1982) に発表された。上記論文は参照によりここに引用される。

生産することができる。

アントニアデス (Antonlades) の米国特許第4479896号（この内容は参照によりここに引用される）では、血小板由来成長因子が同定され、研究のためにゲル電気泳動法により抽出された。

#### 発明の要約

トロンビン活性化血小板は血管形成、増強されたコラーゲン合成および細胞分裂/成長を刺激する能力を有する。全血液試料を利用して血小板に富む血漿を調製し、これをトロンビンで活性化すると、創傷の治療過程を促進するのに使用し得る血管形成因子と成長因子を含む血小板濃厚化血漿が得られることが発見された。

血液を安定化し、遠心して血小板に富む血漿を得る。血液はシトレート-ホスフェート-デキストロースと1:5の比（20%溶液）で混合することにより安定化される。血小板に富む血漿（以後 PRP と略す）は高濃度の血小板が得られるまでさらに遠心することが好ましい。次に、その血小板を血小板用緩衝液に加える。血小板の濃度は1ミリリットル当たり少なくとも1000000個の血小板であり、好ましくは約1000000000個の血小板であるだろう。

PRP にトロンビンを加えて血小板を活性化する。好ましくは、1ミリリットルの PRP 当たり約1〜約10単位のトロンビンを使用する。トロンビン活性化血小板は血小板由来成長因子（以後 PDGF と略す）および血小板由来血管形成因子（以後 PDAF と略す）を放出する。血小板とトロンビンは室温で約5

- 03 a) 血小板を得る；
  - b) 古い血小板から血小板に富む血漿を分離し；
  - c) 該血小板を洗浄して血漿含有物質を除き；
  - d) 血小板に富む血漿 1ml 当たり約1〜約10単位のトロンビンを用いて該血小板を活性化する；
- ことから成る創傷治療物質の生産方法。
- 04 血小板に富む血漿 1ml 当たり約1単位のトロンビンを使用する請求の範囲第13項記載の方法。
  - 05 血液銀行に預けられた有効期限を過ぎた血小板から上記血小板を得る請求の範囲第13項記載の方法。
  - 06 a) 1ml 当たり少なくとも約1000000000個の血小板濃度を有する血小板に富む血漿中の血小板由来の血管形成因子と成長因子；および
  - b) 血小板に富む血漿 1ml 当たり約1〜約10単位のトロンビン；
- を含有する創傷治療用組成物。
- 07 薬学的に受容されるキャリアーをさらに含む請求の範囲第16項記載の組成物。
  - 08 前記キャリアーは微結晶質コラーゲンである請求の範囲第17項記載の組成物。
  - 09 1ml 当たり約1000000000個の血小板濃度である請求の範囲第16項記載の組成物。

血管形成因子と呼ばれる非マイトジェン物質もまたトロンビン活性化血小板により産生され、毛細血管の成長を刺激する。腫瘍、網膜および損傷液 (wound fluid) の血管形成因子を含めて、種々の血管形成因子が知られている。全ての血管形成因子が毛細血管内皮細胞に対して共通の作用機序を有するかどうかについては知られていない。

血管形成因子は単離され、バンダ (M.S.Banda)、ナイトン (D.R.Knighton)、ハント (T.K.Hunt) およびワーブ (Z.Werb) の「損傷液からの非マイトジェン血管形成因子の単離」と題する論文 (*Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 7773-7777, 1982年12月) に発表された。この論文の内容は参照によりここに引用される。

血管形成因子および血小板由来成長因子はナイトン (D.R.Knighton)、ハント (T.K.Hunt)、タクラル (K.K.Thakral) およびグッドソン (W.H.Goodson III) の「治療過程における血小板とフィブリンの役割」と題する論文 (*Annals of Surgery*, 196: 379-388 (1982)) に記載されており、この内容は参照によりここに引用される。この論文には、単一の10単位血小板を輸血した際に患者の非治療性創傷が上唇で治療された旨記載されている。その創傷は3週間後で治癒した。

最近の研究は、人体の正常な治療過程が働く場合に、それは約50%の有効レベルに達するにすぎないことを示している。

トルバート (Tolbert) らの米国特許第4273871号では、ヒト血管形成因子をヒト包皮線維芽細胞から生産している。一般に入手しうる包皮線維芽細胞株を利用して、血管形成因子を

～10分間インキュベートさせる。

PDGF と PDAF を含む活性化 PRP は、好ましくはキャリアーとして作用する生物学的に適合性の高分子物質に加えらる。最初に、血小板を約  $950 \times 9$  で遠心し、血小板不含上清をキャリアーと混合する。生物学的に適合性のキャリアーとしては、例えばペンシルバニア州(19061)マーカスフックの FMC 社、アビセル部門から市販されているアビテン (Avitene) という商標名のコラーゲンのような微結晶質コラーゲンである。微結晶質コラーゲンは人体に適合性である。血液から得られる血小板に富む血漿のすべてを吸収するのに十分なキャリアーが添加される。例えば、40 ml の血液試料は凝固後に一般に約 25 ml のキャリアーを必要とするだろう。こうして得られたペーストは好ましくは氷上または冷蔵庫内に保存される。

ニュージャージー州ビスカタウエーのファーマシア・フアイン・ケミカルズ社からデブリサン (Debrisane) という商標名で市販される創傷用包帯として使用するための医療製剤も適当なキャリアーである。

キャリアー中に吸収された活性化 PRP はその後創傷部位に適用される。その中に高度に凝固された活性 PDGF および PDAF は毛細血管内皮細胞を増殖および成長させ、コラーゲン合成の速度を倍加し、白血球の定着性をうながすことにより治癒を促進させる。マイトジエン活性は細胞分裂/成長を誘起させて、欠損組織を再生させる。

活性 PRP を創傷部位へ毎日適用すると、治癒過程が刺激されかつ促進される。40 ml の血液から調製される PRP の量は

血小板不含血漿は取り出して捨てる。血小板沈殿物を適量の血小板用緩衝液中に再懸濁して最終 ml とする。1 ml 当たり約 100 万個の血小板より低い濃度も使用し得るが、あまり好ましくない。使用する血小板用緩衝液は 0.05 M HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸) 0.03 M グルコース、0.004 M  $KCl$ 、0.1 M  $NaCl$  および約 pH 6.5 に調整された約 0.35 % ヒト血清アルブミンを含む。試料はその後のマイトジエン活性試験のために約 20℃ で凍結する。別の試料は無菌試験として血液寒天上で菌培養する。

血小板に富む血漿は本発明の方法および組成物において利用される唯一の血液成分である。PRP はその後精製トロンビンにより、PRP 1 ml 当たりトロンビン約 1～約 10 単位の割合で活性化される。好ましくは、PRP 1 ml 当たりトロンビン約 1 単位が使用される。トロンビンの働きはフィブリノーゲンを凝固させ、且つ血小板を活性化して血小板由来成長因子と血小板由来血管形成因子を含むアルファ顆粒を放出させる。使用されるトロンビンはイリノイ州カンカークのアーモ・ファーマシューチカル社から市販されているトロンビナー (Thrombinar) という商品である。血小板とトロンビンは室温で約 5～10 分間インキュベートさせる。

次いで、PRP は遠心により血小板とフィブリンの除去に付される。950 × 9、4℃で約 5 分間遠心した後得られる上清は PDAF と PDGF の両方を含む。PDAF と PDGF は上清中に抽出されるので、沈殿物を捨てる。PDGF は単離して

7日間凍結して十分な量である。この物質は創傷部位全体に比較的均一な厚さ(約 2 mm の厚さ)で適用される。人体自身の修復シグナルが良好な治癒を刺激するのに不十分である場合、活性化 PRP の使用により肉芽形成、収縮および上皮形成が開始される。

本明細書中で使用するとき、トロンピンとは血小板放出のための生物学的放出剤としてのトロンピンを意味する。コラーゲン、ADP およびセロトニンを含めて、当分野で知られた他の生物学的放出剤もトロンピンの代わりに又はトロンピンに加えて、血小板を活性化するために使用しうるが、トロンピンが好適である。

#### 発明の詳細な説明

本発明の創傷治癒因子で治療しようとする患者から採取した血液は、酸-シトレート-デキストロース (0.15 M シトレート、2 % グルコース、pH 4.2) (以後 CPD と略記する) を含むシリコン処理試験管中で安定化し、その血液から血小板に富む血漿を分離するために遠心する。40～60 ml の血液を 4～6 ml の CPD と混合し、約  $135 \times 9$ 、約 4℃で 20 分間遠心して血小板に富む血漿を得る。その血漿を取り出して別の無菌の 50 ml 試験管に加える。その後血小板を数える。CPD を利用して血液とプラスチック製注射器との接触による一連の凝血活性化を抑える。血液が患者から採取される間、注射器の中に CPD を入れておく。血液と CPD を連続混合して血液凝固を予防する。その後、試験管中の血小板に富む血漿は  $750 \times 9$ 、4℃で 10 分間遠心する。

性状決定を行った。それは分子量 30000 のタンパク質であり、分子量が 15000 と 14000 の 2 つの物質に分解される。

こうして得られた血小板不含上清中の PDAF および PDGF を創傷部位に適用するために、生物学的に適合性であつて一時的「デポ」として作用するキャリアー物質を使用することが望ましい。微結晶質コラーゲンのような高分子物質がキャリアーである。特に好適なキャリアーはペンシルバニア州(19061)マーカスフックの FMC 社、アビセル部門からアビテンという商標名で市販されている微結晶質コラーゲンである。得られた組成物は粘稠であり、創傷部位に接触した状態で保持されるであろう。セファロースビーズを含むデブリサン創傷用包帯(ニュージャージー州ビスカタウエーのファーマシア・フアイン・ケミカルズ社の商標名)も別のキャリアーとして利用し得る。好ましくは、ペーストを調製するためにキャリアー 1 g 当たり上清約 8～10 ml が使用される。

創傷治癒用組成物の適用は、薬用軟膏を塗るときのようにその物質を創傷部位に物理的に塗布することにより行われる。治癒はその創傷が開口している限り毎日繰り返されるべきである。好適な治癒は朝のうちに血小板/キャリアー複合体から成る約 1 mm の厚さの包帯を患部に適用することである。その後無菌の乾燥包帯を当てる。夜になつてから、包帯を取り除いて、滅菌塩水で洗うことによりその物質を除去する。

本発明の創傷治癒用組成物を使用する臨床試験が身体外部の損傷に対して行われたが、本組成物は身体内部の損傷も同様に

治療し得る。また、この創傷治療用組成物を含ませることにより、内部治療が倍加されるかも知れない。また、創傷治療用組成物は外科手術において使用される移植可能物品や生分解性物品上のコーティングとして、生分解性包帯と共に使用することができる。一般に、患者の中に挿入されるべき外来物体はどれも本組成物で被覆されることにより、その治療過程を倍加し得る。これとは別に、本組成物は患部組織に直接塗布することができる。

最初の臨床試験は、1～5年の間の非治療性創傷を有する8人の患者に対して行われた。全ての患者はその傷をなかそうとして最大限の標準の治療を受けたが、その治療は失敗であった。すべての場合において、血小板由来因子の投与は肉芽組織形成（肉芽組織は繊維芽細胞、内皮細胞およびコラーゲンを含む）によつて示されるように、治療効果を開始させた。創傷は収縮および上皮形成により、あるいは皮膚移植により閉鎖された。すべての適用において、治療の促進およびその結果としての修復が生じた。

創傷治療用の活性化PRPは損傷を受けた動物自身の血液から直接調製することが好ましいが本発明の利点は同じ種の動物から採取した血液または古い（outdated）血小板を使用することにより達成し得る。治療されるべき患者からの血液を利用することは、血液銀行に預けられていた血液から肝炎にかかる可能性やその他の汚染物質にさらされる危険性が避けられるので特に好適である。患者自身の血液の使用はまた起こりうるアレルギー反応を排除するだろう。この物質のばらつきのない供給

PDGF/PDAF含有ペーストを12時間おきに毎日、平均8週間塗布した。毎日、壊死組織を切除した。すべての患部は肉芽組織を産生し、開始時の創傷面積と比較して平均83%が閉鎖された。壊傷の95%は上首尾で治療され、全創傷の上皮形成または上首尾の皮膚移植をもたらした。これらの非治療性壊傷のうち2つのみが治療しなかった。治療した壊傷は過形成性瘢痕や新生物が形成される形跡もなく閉鎖されたままである。

本発明を考慮する場合、開示された実施態様は本発明を例証するためのものであつて、本発明の範囲は次の請求の範囲により定められると理解されるべきである。

傷は洗浄され古い血小板から得られる。この物質はまた動物自身または同じ種に含まれる他の動物から誘導される血小板を利用することにより、獣医学的にも適用しうる。

## 例 I

壊死組織切除および中足骨切断後の左足に開放創を有する患者は、彼自身の血液から上記のようにして得られたPDGFおよびPDAFを用いて治療を開始した。治療計画通りに進行させた後、その傷は新しい肉芽組織によつて埋められた。その後の壊死組織切除は完全におかわれた中足骨とかなり大きい傷の縮小を示した。

## 例 II

患者は右足の親指の切断を行い、3週間標準的な治療法で治療したが創傷内には肉芽組織が染まらなかった。その後、彼は本発明の血小板因子による治療を開始した。治療の3週間後、傷は約30～40%に収縮し、速やかに治療しつつあつた。

## 例 III

中足骨切断後の肢端の内側と外側に2つの大きな傷を有する患者は通常の治療法を使用して4ヶ月間治療したが、治療しなかった。上記のようなPDAFおよびPDGFによる治療の2週間以内に、傷は明らかな感染が除かれ、肉芽組織を産生し始めた。

28人の糖尿病患者からの38の非治療性壊傷をPRPペーストで治療した。治療前の平均壊傷持続期間は6～12年であつた約 $10^9$ 血小板/mlの濃度のPRPから調製したペーストはアビテン（Avitene）コラーゲンと組み合わせられた。患者には

## 国際調査報告

International Application No. PCT/US85/02205		
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's classification, if any, in addition to the IPC classification, should be indicated in the field designated "CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER")		
U.S. 424/101 IPC <sup>4</sup> A61K 35/14		
2. FIELDS SEARCHED		
Classification System Minimum Documentation Searched		
US	424/101 514/2, 773 & 774	Classification System
Documents Searched other than Minimum Documentation		
CHEMICAL ABSTRACTS 10TH COLLECTIVE TO DATE VOL. 86-101 1977-1985		
"BLOOD-PLATELET" "COLLAGEN" "ANIMAL GROWTH FACTOR"		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>1)</sup>		
Category <sup>2)</sup>	Classification of Document, <sup>3)</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>4)</sup>	Relevant to Claim No. 1 <sup>5)</sup>
Y	US, A, 4,479,896 Published Oct. 30, 1984 Antoniades	1-19
Y	US, A, 3,628,974 Published 21 December 1971 Battista	1-19
Y	N, Annals of Surgery Vol. 196 No. 4 (Oct. 1982) Knighton et al, Role of Platelets and Fibrin in the Healing Sequence, pages 379-388	1-19
<sup>1)</sup> Based on the following criteria: <sup>2)</sup> "Y" documents (defining the general state of the art which is not considered to be of particular interest) <sup>3)</sup> "Y" documents (defining the general state of the art which is not considered to be of particular interest) <sup>4)</sup> "Y" documents (defining the general state of the art which is not considered to be of particular interest) <sup>5)</sup> "Y" documents (defining the general state of the art which is not considered to be of particular interest)		
4. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search <sup>1)</sup>	Date of Issuance of the International Search Report <sup>1)</sup>	
23 January 1986	31 JAN 1986	
International Searching Authority <sup>1)</sup>	Signature of the International Searching Authority <sup>1)</sup>	
ISA/US	SAM ROSEN	

Form PCT/ISA-220 (Revised March 1985)